Aus der Universitäts-Frauenklinik und Poliklinik

Würzburg

Direktor: Prof. Dr. K.-H. Wulf

DER EINFLUSS VON DEHYDROEPIANDROSTERONSULFAT AUF DIE GLUCOSE-6-PHOSPHATDEHYDROGENASE DER RATTE IN VIVO

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

HARTWIG SCHAEFER

aus Holzminden

Würzburg, den 15. Nov. 1979

1980

Aus der Universitäts-Frauenklinik und Poliklinik

Würzburg

Direktor: Prof. Dr. K.-H. Wulf

DER EINFLUSS VON DEHYDROEPIANDROSTERONSULFAT AUF DIE GLUCOSE-6-PHOSPHATDEHYDROGENASE DER RATTE IN VIVO

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

HARTWIG SCHAEFER

aus Holzminden

Würzburg, den 15. Nov. 1979

Referent:	Prof. Dr. med. H. Brandau
Korreferent:	Prof. Dr. med. K.-H. Wulf
Dekan:	Prof. Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 15.2.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG 5

B. MATERIAL UND METHODE

1. Versuchstiere 8
2. Hormonbehandlung und Versuchsanordnung 8
3. Extraktgewinnung 9
4. Messung der Enzymaktivitäten 12
5. Statistik 12

C. ERGEBNISSE

I. Enzymaktivitäten in Leberhomogenaten

1. Orale Steroidbehandlung 14
2. Parenterale Steroidbehandlung 16

II. Enzymaktivitäten in Fettgewebshomogenaten

1. Orale Steroidbehandlung 18
2. Parenterale Steroidbehandlung 20

III. Enzymaktivitäten in Erythrozytenhämolysaten

1. Orale Steroidbehandlung 22
2. Parenterale Steroidbehandlung 23

D. DISKUSSION

1. Einflüsse von Resorption und Metabolismus auf den Inhibitorgehalt im Gewebe 25
2. Vergleich von oraler und parenteraler Steroidapplikation 28

3. Auswirkung der peroralen Langzeitbehandlung 29
4. Aktivitätsänderungen bei nicht DHEA spezigisch beeinflußten Hormonen 31
5. Beeinflussung der NADPH abhängigen Biosynthese 34
6. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Untersuchungen anderer Autoren 35

E. ZUSAMMENFASSUNG 38

F. ANHANG

1. Liste der verwendeten Abkürzungen 40
2. Meßreaktionen und Testzusammensetzungen 41
3. Literaturverzeichnis 43

A. EINLEITUNG

Erkenntnisse der letzten Jahre zeigen, daß Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) als sulfonkonjugiertes C_{19}-Steroid eine größere physiologische Bedeutung hat als die eines ursprünglich angenommenen reinen Urinmetaboliten. So konnte beispielsweise dargestellt werden, daß DHEAS - als Steroid im menschlichen Plasma mengenmäßig am bedeutendsten (Oertel, 1971a) - sowohl in vivo als auch unter in vitro Bedingungen von der Nebenniere gebildet wird (Baulieu, 1962; Wallace und Liebermann, 1963; Cohn et al., 1963). Neben einer freien Konvertierbarkeit von DHEAS und Dehydroepiandrosteron (DHEA) (Roberts et al., 1961) wird zirkulierendes DHEAS bei schwangeren Frauen in beträchtlichem Umfang zu Östrogenen metabolisiert (Siiteri und Mc Donald, 1966; Baulieu und Dray, 1963). Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß DHEA ein Hauptprecursor von Testosteron darstellt (Slaunwhite, 1967).

Neben der Rolle des DHEAS bzw. DHEA als Vorläufer aktiver Substanzen mit geschlechtsspezifischer Wirkung scheint dieses Steroid durch seine Fähigkeit, die Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G_6PDH) zu hemmen, eine "nicht hormonelle" Funktion zu besitzen.

Erstmalig bei in vitro Untersuchungen zeigte sich, daß DHEA eine starke nicht kompetitive Hemmung der G_6PDH aus verschiedenen Säugetiergeweben bewirkt (Marks und Banks, 1960; McKerns und Kaleita, 1960;). Später wurde der Inhibitoreffekt auch unter in vivo

Bedingungen nachgewiesen (Willmer und Forster, 1965; Lopez-S. und Krehl, 1967a; Hori und Matsui, 1967). Bei Patienten mit niedriger DHEA-Sekretion fand sich damit vergesellschaftet eine erhöhte Aktivität der Enzyme des Pentose-phosphat-shunt (PPS) in Erythrozyten (Sonka et al., 1965; Lopez und Krehl, 1967b). Eine erniedrigte DHEA-Sekretion fand sich zudem bei Patienten, deren Status durch Fettsucht, Diabetes mellitus, Hochdruck, Hypercholesterinaemie gekennzeichnet ist, und bei der Akne vulgaris (Sonka et al., 1964, 1965; Adlercreutz et al., 1968; Holzmann et al., 1970; Oertel et al., 1971b). Es wurde daraus die Hypothese formuliert, daß ein erniedrigter DHEA-Spiegel über die dadurch entfallende Hemmung der G_6PDH die NADPH abhängige Biosynthese, vor allem die Fett- und Steroidsynthese, stimulieren könnte (Sonka et al., 1965; Gianelly, 1968).

Die "nicht hormonelle" Funktion des sulfonkonjugierten DHEA, das sich im Gegensatz zum freien Alkohol bei in vitro Versuchen als Inhibitor der G_6PDH als untauglich erwiesen hat (Tomkin et al., 1961; Oertel et al., 1969, 1970a-c), ist in dieser Arbeit Gegenstand weiterer Untersuchungen. Es zeigte sich nämlich, daß DHEAS nach oraler Applikation sehr wohl eine inhibitorische Wirkung auf die G_6PDH menschlicher Erythrozyten ausübt (Lopez-S. und Krehl, 1967a; Brandau und Luh, 1968; Oertel et al., 1971b). Eine an Ratten und Meerschweinchen durchgeführte gleichartige Untersuchung führte dagegen zu widersprüchlichen Ergebnissen (Hilgertova und Sonka, 1973; Bergmann und Oertel, 1975). Es er-

schien daher zweckmäßig, DHEAS - oral und subcutan verabreicht - in seiner Inhibitoreigenschaft gegenüber G_6PDH in Erythrozyten und weiteren Geweben wie Leber und Fett erneut zu versuchen. Neben der Aktivität der G_6PDH werden vier weitere rein cytoplasmisch lokalisierte Enzyme gemessen. Aus den beiden Hauptketten des Glucoseabbaus sind dies 6-PGDH, HK, HIM und GAPDH[+].

[+] Eine Liste mit Erklärungen der verwendeten Abkürzungen findet sich im Anhang.

B. MATERIAL UND METHODE

1. Versuchstiere:

Für die vorliegenden Untersuchungen werden geschlechtsreife weibliche Holtzmann-Ratten (Holtzmann & Co., Madison, Wisc. U.S.) verwendet. Ihr Gewicht beträgt 220 ± 20 Gramm und ihr Alter 90 bis 120 Tage. Die Aufzucht und Stallhaltung erfolgt unter konstanten Bedingungen. Die Tiere erhalten standardisiertes Trockenmischfutter und Wasser ad Libitum.

2. Hormonbehandlung und Versuchsanordnung:

Das verwendete Steroid DHEAS (17-oxoandrost-5-en-3β-yl-sulfat) stellt die Firma Hoffmann-La Roche AG/Grenzbach/Baden zur Verfügung. DHEAS wird in drei Versuchsreihen oral bzw. subcutan verabreicht, wobei die Dosis und die Behandlungsdauer variiert sind.

In einer ersten Versuchsreihe wird das DHEAS fünf Tieren oral verabreicht. Das Steroid ist dem Trinkwasser der in Einzelkäfigen gehaltenen Tiere in einer Konzentration von 2 mg/ml zugesetzt. Nach 7 1/2 tägiger Versuchsdauer errechnet sich aus der Gesamttrinkwassermenge eine mittlere Tagesdosis von 36 mg, was einer Tagesdosis von 15 mg pro 100 g Rattengewicht entspricht.

In einer zweiten Versuchsreihe wird fünf Tieren Trinkwasser mit der gleichen Steroidkonzentration über einen Zeitraum von 15 Tagen verabreicht. Die mittlere Tagesdosis beträgt 38 mg, entsprechend 18 mg pro 100 g Rattengewicht.

In einer dritten Versuchsreihe erhalten vier Tiere gleichmäßig über vier Tage verteilt acht Injektionen zu 10 mg DHEAS unter die Rückenhaut. 10 mg DHEAS sind in 2 ccm Aqua dest. gelöst. Aus der injizierten Gesamtdosis berechnet sich eine mittlere Tagesdosis von 9 mg pro 100 g Rattengewicht. Zwölf Stunden nach der letzten Injektion werden die Tiere getötet.

Als Kontrolltiere dienen unbehandelte Ratten, die jeweils unter den gleichen Bedingungen wie die Testtiere gehalten werden. Ihre Anzahlen sind in den Tabellen 1 - 8 aufgeführt.

3. Extraktgewinnung

Den Tieren wird in flacher Äthernarkose auf einem Operationstisch der Thorax geöffnet und durch Punktion der linken Herzkammer 5 ml Citratblut entnommen. Nach Durchtrennen der Carotiden und Ausbluten in Kopftieflage wird die Leber und anschließend das parauterine Fettgewebe entnommen. Blut und Gewebe werden sofort in der Kälte zu Hämolysat bzw. Homogenat aufgearbeitet und diese als Medium zur Bestimmung von Enzymaktivitäten eingesetzt. Im Detail wird wie folgt verfahren:

a. Technik der Extraktgewinnung aus Leberparenchym:

1. Dem aus dem rechten Leberhauptlappen gewonnenen Gewebe wird die 21-fache Menge an eisgekühltem Phosphatpuffer zugegeben (0.1 M Na_2HPO_4/KH_2PO_4, 2 M EDTA; pH = 7.2).
2. Im Kältebad (-4°C) erfolgt die Aufschließung des Gewebes mit Hilfe eines Ultra-turax-Homogenisators (Typ TP18/2, Janke & Kunkel, KG, Staufen i. Br.). Es wird 6 x 20 sec. bei 20.000 U/min homogenisiert, wobei zwischen jedem Arbeitsgang eine Pause von 1 min. eingehalten wird.
3. Das Homogenat wird 20 min. mit einem Magnetrührer bei 0°C durchmischt und anschließend
4. 15 min. mit der Spinco-Kühlzentrifuge bei 100.000 g zentrifugiert.
5. Der Oberstand dient der Bestimmung von Ezymaktivitäten und Proteingehalt. Das Sediment wird verworfen.

b. Technik der Extraktgewinnung aus Fettgewebe:

1. Das seitlich der beiden Uterushörner liegende Fettgewebe wird unter Zurücklassung des unmittelbar am Uterus liegenden Gefäßnetzes herauspräpariert und diesem die 11-fache Menge eisgekühlten Phosphatpuffers (0.1 M Na_2HPO_4/KH_2PO_4, 2 M EDTA; pH 7,2) zugegeben.
2. Die weitere Aufarbeitung des Gewebes erfolgt wie oben unter 3a, 2 - 5 beschrieben ist.

c. Technik der Blutaufbereitung und Hämolyseherstellung:

1. Das durch Punktion der linken Herzkammer gewonnene Citratblut (1:5) wird bei $0^{o}C$ mit 3.000 U/min 5 min. zentrifugiert. Anschließend werden Serum und Leukozytenschicht mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und eisgekühlte physiologische Kochsalzlösung im Verhältnis 1:1 hinzugegeben. Nach vorsichtigem Umrühren wird wie oben zentrifugiert und der Oberstand abgesaugt. Dieser Waschvorgang wird noch einmal wiederholt.

2. 0.4 ml der gewaschenen Erythrozyten und 0.4 ml Ringer/Phosphatlösung (100 ml Ringer-Lösung und 20 ml 0.25 M Na_2HPO_4, Ph 7.4) werden in 3 ml einer zu gleichen Teilen TRAP/EDTA (50 mM/5 mM) Aqua bidest und o.5 M $NaHCO_3$ enthaltenen Lösung suspendiert.

3. In dieser Erythrozytensuspension werden mit Hilfe des Erymaten (Fa. Hellige & Co., Freiburg i. Br.) die Erythrozytenzahl pro ml bestimmt. Die in der Tabelle 8 aufgeführten Ergebnisse basieren auf Erythrozytenmessungen, die mit der Zeiss-Zählkammer vorgenommen werden. Das Ausgangsmedium ist dabei die Erythrozyten-Ringerphosphat-Aufschwemmung.

4. Es folgt nun die Erythrozytenaufschließung mit dem Ultraschallgerät (MSE 100 W Modell 7100). Es wird 4 x 10 sec bei einer Amplitude von 7 Mikron beschallt, wobei zwischen jedem Beschallvorgang eine Pause von 1 min. eingehalten wird. Ein Kältebad ($-5^{o}C$) sorgt für die erforderliche Wärmeableitung.

5. Das Hämolysat wird bei 3.000 U/min. 20 min. zentrifugiert. Das Sediment wird verworfen und der Oberstand als Extrakt eingesetzt.

4. Messung von Enzymaktivitäten:

Die Aktivitäten aller untersuchten Enzyme werden mit Hilfe der optischen Tests nach Warburg und Christian (1936) über den Umsatz von Pyridinnucleotiden bestimmt. Zur Erlangung optimaler Substrat-, Coenzym- und Hilfsenzymkonzentration werden die Angaben von Bücher, Luh und Pette (1964) zu Grunde gelegt. Stets wird die Aktivität eines jeden Enzyms durch Doppelbestimmung am gleichen Extrakt mit Hilfe unterschiedlicher Enzymkonzentrationen ermittelt. Für alle Enzymaktivitäten wird eine Internationale Einheit (IE) als der Enzymbetrag definiert, der 1 /uMol Pyridinnucleotid in einer Minute bei 366 nm oxydiert bzw. reduziert. Bezugsgrößen sind das Frischgewicht (Fg) in Gramm (g) und ein Zellvolumen von 10^{11} Erythrocyten.

Als Meßgerät dient ein Eppendorf Photometer mit angeschlossenem Linearschreiber. Die verwendeten Enzyme werden von der Firma Boehringer/Mannheim bezogen. Untersucht werden G_6PDH (EC 1.1.1.49)$^+$ und 6PGDH (EC 1.1.1.44) als Enzyme der direkten Glukoseoxydation sowie HK (EC 2.7.1.1.), HIM (EC 5.3.1.9.) und GAPDH (EC 1.2.1.12) als Enzyme der Embden-Meyerhof-Kette. Meßreaktion und Testzusammensetzung für die genannten Enzyme sind im Anhang aufgeführt.

5. Statistik:

Die bei den Ergebnissen aufgeführten Enzymaktivitäten sind Mittelwerte aus den Einzelaktivitäten von 4 - 11 Extrakten. Die Standardabweichung $\pm s_{\bar{x}}$ vom Mittelwert wird nach der Formel $s_{\bar{x}} = \pm \sqrt{\frac{\Delta d^2}{n(n-1)}}$

berechnet, wobei "d" die Differenz des Einzelwertes vom Mittelwert und "n" die Anzahl der Extrakte bedeutet.

Die Prüfung auf Ergebnisunterschiede vor und nach Gabe von DHEAS wird mit Hilfe des t-Testes für unverbundene Stichproben durchgeführt. Als statistisch signifikant wird dabei ein Ergebnis angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner oder gleich 5 % ist ($p \leqq 0.05$).

+ Verzeichnis für Enzymabkürzungen siehe Anhang; in Klammern die internationalen Enzymbezeichnungen nach "Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry", Oxford 1961, Pergamon Press.

C. ERGEBNISSE

I. Enzymaktivitäten in Leberhomogenaten:

1a. Nach oraler Verabreichung von 15 mg DHEAS pro Tag und 100 g Rattengewicht über einen Zeitraum von 7 1/2 Tagen zeigen die gemessenen Enzyme des Pentose-Phosphat-Shunt einen starken, signifikanten Aktivitätsverlust. Die G_6PDH zeigt eine Aktivität von 1.81 IE/gFg gegenüber dem Kontrollwert bei unbehandelten Tieren von 3.09 IE/gFg. Der prozentuale Aktivitätsverlust beträgt 41 % und ist damit der stärkste, der bei den verschiedenen Versuchsanordnungen ermittelt wurde. Die Aktivität der nachgeschalteten 6PGDH sinkt auf 2.93 IE/gFg. Der Aktivitätsverlust gegenüber dem Kontrollwert von 3.94 IE/gFg beträgt hier 26 % und ist ebenfalls statistisch gesichert.

Tabelle 1: Enzymaktivitätsveränderungen in Leberhomogenaten nach 7 1/2 tägiger oraler Verabreichung von DHEAS

	G6PDH	6PGDH	HK	HIM	GADPH
	IE / gramm Frischgewicht				
Kontr. wert(11)	3.09±0,80	3.94±0.40	1.28±0.28	74.67±11.05	120.54±10.26
DHEAS beh.(5)	1.81±0.54 ++	2.93±0.50 ++	1.77±0.41 +	86.20±3.10 +	121.31± 3.99
Aktivit. änd.i.%	-41	-26	+38	+15	---

Angegebene Zahlenwerte bedeuten Mittelwerte in IE/gFg; die zugehörige Standardabweichung ist mit ± angegeben; in ( ) Anzahl der Versuchstiere; Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 1 % ($p < 0.01$) = ++, kleiner 5 % ($p < 0.05$) = +.

Die glykolytischen Enzyme zeigen ein unterschiedliches Verhalten. Während die GAPDH, die bei Kontrolltieren eine Aktivität von 120.54 IE/gFg zeigt, mit einer Aktivität von 121.31 IE/gFg beinahe unverändert gefunden wird, zeigen die beiden anderen gemessenen Enzyme HK und HIM eine statistisch signifikante Aktivitätssteigerung. Die Aktivität der HK nimmt von 1.28 IE/gFg auf 1.77 IE/gFg und diejenige der HIM von 74.67 IE/gFg auf 86.20 IE/gFg zu.

1b. Nach 15 tägiger oraler Verabreichung von 18 mg DHEAS pro Tag und 100 g Rattengewicht zeigen sich wiederum statistisch signifikante Aktivitätsverminderungen bei Enzymen des Pentose-Phosphat-Shunt der Leber. Der Aktivitätsverlust beträgt für die G6PDH 31 % und für die 6PGDH 32 %. Die Enzymbeträge sinken für die G6PDH von 3.09 IE/gFg auf 2.13 IE/gFg und für die 6PGDH von 3.94 IE/gFg auf 2.66 IE/gFg. Der Inhibitoreffekt, der bereits nach 7 1/2 tägiger Versuchsdauer sehr ausgeprägt war, ist hier abgeschwächt, während sich der Aktivitätsverlust der 6 PGDH noch etwas verstärkt.

Tabelle 2: Enzymaktivitätsänderung in Leberhomogenaten nach 15 tägiger oraler Verabreichung von DHEAS

	G6PDH	6PGDH	HK	HIM	GAPDH
	IE / gramm Frischgewicht				
Kontr. wert(11)	3.09±0.80	3.94±0.40	1.28±0.28	74.67±11.05	120.54±10.26
DHEAS beh.(5)	2.13±0.55^{++}	2.66±0.44^{++}	2.22±0.31^{++}	73.24± 5.09	121.25± 2.68
Aktivit. änd.i.%	-31	-32	+73	---	---

$p < 0.01$ = $^{++}$; weitere Erläuterungen siehe Legende zu Tabelle 1

Die beiden aus der Hauptkette der Glykolyse gemessenen Enzyme GAPDH und HIM zeigen mit ihren Aktivitäten von 121.25 IE/gFg bzw. 73.24 IE/gFg gegenüber den Kontrollwerten von 120.54 IE/gFg bzw. 74.67 IE/gFg keine statistisch erfaßbaren Unterschiede. Die Hexokinase erfährt bei dieser Versuchsanordnung die größte Aktivitätsänderung. Der Aktivitätszuwachs von 1.28 IE/gFg bis 2.22 IE/gFg beträgt 73 % und ist statistisch abgesichert; er ist fast doppelt so hoch wie bei halb so langer Steroidbehandlung.

2. Die subcutane Verabreichung von 9 mg DHEAS pro Tag und 100 g Rattengewicht erzeugt bei allen getesteten Enzymen eine Aktivitätsabnahme zwischen 5 und 18 %, wobei die der G6PDH am geringsten ist. Im einzelnen zeigen sich die folgenden Ergebnisse.

Tabelle 3: Enzymaktivitätsänderungen in Leberhomogenaten nach 4 tägiger subcutaner Verabreichung von DHEAS

	G6PDH	6PGDH	HK	HIM	GAPDH
	IE / gramm Frischgewicht				
Kontr. wert(11)	3.09±0.80	3.94±0.40	1.28±0.28	74.67±11.05	120.54±10.26
DHEAS beh.(4)	2.94±0.10	3.27±0.46 ++	1.13±0.10	60.72± 7.08 +	103.13±18.24 ++
Aktivit. änd.i.%	---	-17	---	-18	-14

$p < 0.01$ = ++; weitere Erläuterungen siehe Legende zu Tabelle 1.

Die Aktivität der G6PDH ist mit 2.94 IE/gFg gegenüber dem Kontrollwert 3.09 IE/gFg nicht verschieden, während der Aktivitätsverlust der 6PGDH von 3.94 IE/gFg auf 3.27 IE/gFg statistisch signifikant ist und 17 % beträgt. Die beiden aus der Embden-Meyerhof-Kette stammenden Enzyme HIM und GAPDH zeigen eine Aktivität von 60.72 IE/gFg bzw. 103.13 IE/gFg gegenüber den Kontrollwerten von 74.67 IE/gFg bzw. 120.54 IE/gFg. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für die 18 % Aktivitätsabnahme der HIM beträgt $p < 5$ %, die für die 14 %ige Aktivitätsabnahme der GAPDH $p < 1$ %. Die Hexokinase wird mit 1.13 IE/gFg zwar erniedrigt gefunden, doch kann dieser Aktivitätsverlust statistisch nicht abgesichert werden.

II. Enzymaktivitäten in Fettgewebshomogenaten:

1a. Nach oraler Verabreichung von 15 mg DHEAS pro Tag und 100 g Rattengewicht zeigt sich von den getesteten Enzymen ausschließlich die Aktivität der G6PDH statistisch signifikant verschieden vom zugehörigen Kontrollwert. Die absolute Aktivität fällt von 543 mIE/gFg auf 389 mIE/gFg, was einem Aktivitätsverlust von 28 % entspricht. Die Aktivität der im PPS nachgeschalteten 6PGDH wird mit 376 mIE/gFg gegenüber dem Kontrollwert mit 326 mIE/gFg zwar erniedrigt gefunden, doch kann der rechnerische Aktivitätsverlust von 13 % statistisch nicht abgesichert werden.

Die ermittelten Aktivitäten für die glykolytischen Enzyme weisen gegenüber den Kontrollwerten geringe Schwankungen auf, die sich jedoch statistisch nicht erfassen lassen. Im einzelnen werden für die GAPDH 4.06 IE/gFg und für HIM 6.22 IE/gFg gemessen; die entsprechenden Kontrollwerte betragen 3.93 IE/gFg bzw. 6.13 IE/gFg. Desgleichen ist auch die Hexokinase mit 128 mIE/gFg gegenüber dem Kontrollwert von 146 mIE/gFg statistisch nicht verschieden.

(siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Enzymaktivitätsänderungen in Fettgewebshomogenaten nach 7 1/2 tägiger oraler Verabreichung von DHEAS

	G6PDH	6PGDH	HK	GAPDH	HIM
	mIE / gramm Frischgewicht			IE / gramm Frischgewicht	
Kontr. wert(11)	543±109	376±94	146±43	3.93±0.94	6.13±1.15
DHEAS beh.(5)	389± 67 $^{++}$	326±52	128±25	4.06±0.43	6.22±0.88
Aktivit. änd.i.%	- 28	(-13)	---	---	---

$p < 0.01$ = $^{++}$; weitere Erläuterungen siehe Legende zu Tabelle 1.

1b. Die orale Verabreichung von 18 mg DHEAS pro Tag und 100 g Rattengewicht führte nach 15 tägiger Versuchsdauer bei keinem der getesteten Enzyme zu einer statistisch erfaßbaren Aktivitätsänderung.

Die getesteten Enzyme des Pentose-Phosphat-Shunt G6PDH und 6PGDH zeigen im Ergebnis 491 mIE/gFg und 385 mIE/gFg gegenüber den Kontrollwerten von 543 mIE/gFg bzw. 376 mIE/gFg.

Den Enzymen der Embden-Meyerhof-Kette GAPDH mit 4.40 IE/gFg und HIM mit 7.03 IE/gFg stehen Kontrollwerte von 3.93 IE/gFg bzw. 6.13 IE/gFg gegenüber, ohne daß diese augenscheinliche Aktivitätssteigerung statistisch belegbar wäre. Die HK zeigt mit 137 mIE/gFg ebenfalls keinen Unterschied zum Kontrollwert von 146 mIE/gFg.

Tabelle 5: Enzymaktivitätsänderungen in Fettgewebshomogenaten nach 15 tägiger oraler Verabreichung von DHEAS

	G6PDH	6PGDH	HK	GAPDH	HIM
	mIE / gramm Frischgewicht			IE / gramm Frischgewicht	
Kontr. wert(11)	543±109	376±94	146±43	3.93±0.94	6.13±1.15
DHEAS beh.(4)	491±132	385±54	137±48	4.40±0.47	7.03±0.32

Erläuterungen siehe Legende zu Tabelle 1.

2. Nach 4 tägiger subcutaner Application von 9 mg DHEAS pro Tag und 100 g Rattengewicht weist die G6PDH eine statistisch signifikante Aktivitätsverminderung von 22 % auf, wobei die absolute Aktivität von 543 mIE/gFg auf 423 mIE/gFg sinkt. Die 6PGDH ist mit 349 mIE/gFg gegenüber dem Kontrollwert von 376 mIE/gFg nicht verschieden.

   Die Enzyme GAPDH und HIM zeigen mit 4.08 IE/gFg und 6.91 IE/gFg gegenüber ihren zugehörigen Kontrollwerten 3.93 IE/gFg bzw. 6.13 IE/gFg keinen signifikanten Unterschied.

   Einen starken Aktivitätszuwachs erfährt die HK, deren Enzymaktivität von 146 mIE/gFg auf 213 mIE/gFg steigt, das heißt um 46 %. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt unter 1 %.

Tabelle 6: Enzymaktivitätsänderung in Fettgewebshomogenaten nach 4 tägiger subcutaner Verabreichung von DHEAS

	G6PDH	6PGDH	HK	GAPDH	HIM
	mIE / gramm Frischgewicht			IE / gramm Frischgewicht	
Kontr. wert(11)	543±109	376±94	146±43	3.93±0.94	6.13±1.15
DHEAS beh.(4)	423± 32^{+}	349±76	213±36^{++}	4.08±1.38	6.91±1.39
Aktivit. änd.i.%	- 22	---	+46	---	---

$^{++}$ = $p < 0.01$; $^{+}$ = $p < 0.05$; weitere Erläuterungen siehe Legende zu Tabelle 1.

III. Enzymaktivitäten in Erythrozytenhämolysaten:

1. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der nach 7 1/2 und 15 tägiger oraler DHEAS-Belastung in Erythrozyten gemessenen Enzymaktivitäten wiedergegeben. Die statistisch erfaßbaren Aktivitätsänderungen sind insgesamt sehr gering. Nach 7 1/2 tägiger Versuchsdauer werden die Enzyme des PPS G6PDH und 6PGDH mit 13.35 IE/10^{11} Ery und 5.82 IE/10^{11} Ery gegenüber den Kontrollwerten von 15.32 IE bzw. 6.86 IE erniedrigt gefunden. Der prozentuale Verlust der G6PDH beträgt 13 %, ohne bei der geringen Anzahl von Versuchen eine Signifikanz zu erreichen ($p > 0.05 < 0.1$), derjenige für die 6PGDH 15 % mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5 % ($p < 0.05$).

   Nach 15 tägiger Versuchsdauer zeigen die gemessenen PPS-Enzyme einen "Wiederanstieg" und keinen statistisch erkennbaren Unterschied zu den Kontrollwerten.

   Die Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges zeigen trotz teilweise größerer Schwankungen, insbesondere der GAPDH, gegenüber den Kontrollwerten keinen signifikanten Unterschied. Zahlenwerte sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Enzymaktivitätsänderungen im Erythrozytenhämolysat nach 7 1/2 tägiger und 15 tägiger oraler Verabreichung von DHEAS

	G6PDH	6PGDH	HK	HIM	GAPDH
	IE / 10^{11} Erythrozyten				
Kontr. wert(4)	15.32±2.24	6.86±0.90	5.59±1.88	163.50±24.4	141.30±36.80
DHEAS oral 7 1/2 Tage(4)	13.35±0.82§	5.82±0.46+	5.92±1.38	148.70±12.4	107.20±30.22
DHEAS oral 15 Tage (4)	14.37±3.16	7.24±1.44	5.56±0.96	161.93±17.7	125.50±34.70

$p < 0.05$ = +; $p < 0.10$ = §; weitere Erläuterungen siehe Legende zu Tabelle 1.

2. Nach subcutaner Injektion des Steroids zeigt sich eine statistisch gesicherte Aktivitätsänderung der Enzyme der direkten Glukoseoxydaten in Erythrozyten. Dabei sinkt die Aktivität der G6PDH von 17.30 IE/10^{11} Erythrozyten auf 14.18 IE/10^{11} Erythrozyten und die der 6PGDH steigt von 5.82 IE/10^{11} Erythrozyten auf 7.39 IE/10^{11} Erythrozyten.

   Die Enzymaktivitäten der Hauptkette des Glucoseabbaus zeigen bei nur geringfügigen Schwankungen ihrer absoluten Werte keine signifikanten Unterschiede. Die einzelnen Werte sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Enzymaktivitätsänderungen im Erythrozytenhämolysat nach 4 tägiger subcutaner Injektion von DHEAS

	G6PDH	6PGDH	HK	HIM	GAPDH
	IE /10^{11} Erythrozyten				
Kontr. wert(6)	17.30±1.19	5.82±0.43	3.56±1.76	123.50±20.30	149.0±37.8
DHEAS sc. 4 Tg. (4)	14.18±2.18^{+}	7.39±0.11^{++}	3.27±1.43	142.30±20.30	147.9± 7.2

$p < 0.01 = {}^{++}$; $p < 0.05 = {}^{+}$; weitere Erläuterungen siehe Legende zu Tabelle 1.

D. DISKUSSION

Die vorgelegten Untersuchungen zeigen nach exogener DHEAS-Zufur in allen untersuchten Geweben eine mehr oder weniger starke Depression der G_6PDH-Aktivität (Tabelle 9). Außerdem ergibt sich eine uneinheitliche Aktivitätsbeeinflussung der Enzyme der Glykolyse und der 6PGDH. Diese Ergebnisse stehen im krassen Gegensatz zu in vitro Untersuchungen, die keine spezifische Hemmung der G_6PDH durch DHEAS oder eine Beeinflussung anderer Enzyme des energieliefernden Stoffwechsels erbracht haben (Tsutsui et al., 1962; Brandau und Luh, 1968; Oertel, 1970b).

1. Die Inhibitoreigenschaft des DHEAS in bezug auf die G_6PDH muß in vivo folglich mit einer Umwandlung in eine wirksame Inhibitorform wie freier Alkohol (DHEA), Sulfatid (DHEASD) - der Steroidester der Digylceridschwefelsäure (Oertel und Groot, 1965) - oder einem Metaboliten z. B. Androsteron oder Ätiocholanolon verknüpft sein (Lopez und Rene, 1973). Nach intraintestinaler Applikation von doppelt markiertem DHEAS wurden beim Meerschweinchen als auch beim Menschen im peripheren Plasma doppelt markierte Sulfonkonjugate als Beweis der intestinalen Resorption gefunden (Knapstein et al., 1966; 1967;). Daneben ist zu erwarten, daß durch prä- und intrahepatische Hydrolyse bzw. Spaltung der Sulfatbindung freie Steroide und nachfolgend wieder Sulfonkonjugate und Glukoronoside gebildet werden (Fries et al., 1967; Oertel und Knapstein, 1967). Perfusionsstudien an tierischen und menschlichen Organen bzw. Geweben zeigen, daß DHEAS

von diesen unterschiedlich metabolisiert wird. So entsteht in der Meerschweinchenleber vor allem DHEA-Sulfatid und im menschlichen Muskel durch rasche Hydrolyse überwiegend DHEA (Weinand et al., 1966; Hoffmann et al., 1974). Unter der Annahme ähnlicher Bedingungen bei der Ratte muß in den hier untersuchten Homogenaten mit einer schwer abschätzbaren Mischung von Steroidsulfat, Steroidsulfatid, unkonjugiertem Steroid und Metaboliten, die aufgrund einer 17-oxo-Konfiguration ebenfalls als Inhibitor wirksam werden können (Marks und Banks, 1960; Oertel und Benes, 1972), gerechnet werden.

(Tabelle 9).

Tabelle 9: Zusammenfassung der Versuchsergebnisse aus den Tabellen 1 - 8

Gewebe	Behandlungsdauer tägl. DHEAS-Dosis/100 gKG Art der Verabreichung Zahl der Versuchstiere ( )	Relative Enzymaktivitäten				
		G_6PDH	6PGDH	HK	HIM	GAPDH
Leber	unbehandelt (11)	100	100	100	100	100
	7,5 Tage, 15 mg, oral (5)	59^{++}	74^{++}	138^{+}	115^{+}	101
	15 Tage, 18 mg, oral (5)	69^{++}	68^{++}	173^{++}	98	101
	4 Tage, 9 mg, s.c. (4)	95	83^{++}	88	81^{+}	86^{+}
Fett	unbehandelt (11)	100	100	100	100	100
	7,5 Tage, 15 mg, oral (5)	72^{+}	87	88	101	103
	15 Tage, 18 mg, oral (4)	$90^{\S}$	102	94	115	112
	4 Tage, 9 mg, s.c. (4)	78^{+}	93	146^{++}	113	104
Blut	unbehandelt (6)	100	100	100	100	100
	7,5 Tage, 15 mg, oral (5)	$87^{\S}$	85^{+}	106	91	76
	15 Tage, 18 mg, oral (4)	94	106	99	99	89
	4 Tage, 9 mg, s.c. (4)	82^{+}	115	102	104	99

$^{++}$ = $p < 0.01$; $^{+}$ = $p < 0.05$; § = $p > 0.05 < 0.1$

2. Die Enzymaktivitätsänderungen in den untersuchten Geweben zeigen in der Leber den größten Umfang. Dies scheint für die enterale Steroidverabreichung verständlich, da der Leber über die Pfortader die größte Steroidmenge zufließt. Sulfatasen bzw. Esterasen sorgen für die Umwandlung zu freien DHEA bzw. DHEASD (Roy, 1957), sofern nicht bereits durch Hydrolyse im Magen oder Veresterung in der Darmwand (Oertel und Knaps tein, 1967) vorher bereits potente Inhibitoren entstanden sind. Insgesamt wirkt die Leber, wie Perfusionsuntersuchunen ergaben (Weinand et al., 1966), als ein Filter und Rückhaltebecken für Steroide. Hieraus läßt sich kalkulieren, daß die Periphierie - hier Fettgewebe und Blutzellen - relativ weniger Steroid bzw. unterschiedliche Steroidkonjugate und Metaboliten erreichen. Entsprechend liegen die höchsten prozentualen Aktivitätsverluste hier auch mit 28 % (Fett) und 13 % (Blut) deutlich unter dem Leberwert von 41 %.

   Ein umgekehrtes bis fehlendes Konzentrationsgefälle des Steroids bzw. eine homogenere Verteilung auf den Gesamtorganismus ist möglicherweise bei der parenteralen Behandlung verantwortlich für die etwa gleich starke aber vergleichsweise geringe Beeinflussung der G_6PDH im Blut mit 18 % und im Fettgewebe mit 22 % gegenüber einem nur 5 %igen Aktivitätsabfall in der Leber, wobei letzterer Wert durch die experimentellen Bedingungen, z. B. die der inhibitorischen Wirkung des Steroids entgegengesetzte Streßwirkung durch die Injektionsprozedur, möglicherweise zu niedrig ermittelt wurde. Die Tatsache, daß eine Vielzahl von Blutumläufen erforderlich ist bis sämt-

liches parenteral verabreichtes Steroid die Leber einmal passiert hat, erklärt theoretisch für die Leber-G_6PDH einen niedrigeren Inhibitionswert nach subcutaner als nach oraler Steroidbehandlung. Die Applikationsform und die Dosis beeinflußt bei dem hier gewählten Versuchsaufbau die G_6PDH-Aktivitäten in Fett und Blut weniger als die Behandlungsdauer.

3. Dosisunabhängige Aktivitätsänderungen ergeben sich bezüglich der Behandlungsdauer in der peroralen Versuchsreihe. Nach 15tägiger Versuchsdauer liegen die reduzierten G_6PDH-Aktivitäten über denen nach 7 1/2-tägiger Versuchsdauer, die im Blut und Fettgewebe erzielten Aktivitätswerte liegen dadurch sicherlich schon innerhalb der Fehlerbreite der angewendeten Methode (siehe Abbildung 1). Dieser "Wiederanstieg" der G_6PDH-Aktivität läßt auf eine Verminderung der Inhibitorsubstanz unter physiologischen Bedingungen bei Langzeitbehandlung schließen, die durch verstärkten Metabolismus, beschleunigte Glucoronisierung mit Ausscheidung über die Galle (Knapstein et al., 1967) oder durch eine beschleunigte Inaktivierung aufgrund einer Änderung des 17ß-hydrooxysteroiddehydrogenase-Redoxgleichgewichtes ausgelöst wird. Der Vorgang läßt sich aber auch als eine de novo Synthese von Enzym in Anwesenheit eines bekannten Inhibitors verstehen, gewissermaßen als Gegenregulation, um den physiologischen Erfordernissen einer genügenden NADPH-Bereitstellung zu genügen. Um diese Hypothese zu stützen, wäre jedoch die Kenntnis der absoluten Inhibitorkonzentration im Gewebe bzw. in der Cuvette notwendig. Da durch DHEAS eindeutige

östrogene Effekte auslösbar sind (Harper, 1969; Puche, 1967) und andererseits Östrogen eine starke Aktivierung der G_6PDH zur Folge hat, könnte der Aktivitätsanstieg bei hohem Steroideinsatz auch mit einem solchen Effekt zusammenhängen. Ähnliche Untersuchungen mit dem Meerschweinchen ließen keine Abschwächung des Steroideffekts nach längerer Behandlungsdauer erkennen (Bergheim und Oertel, 1975).

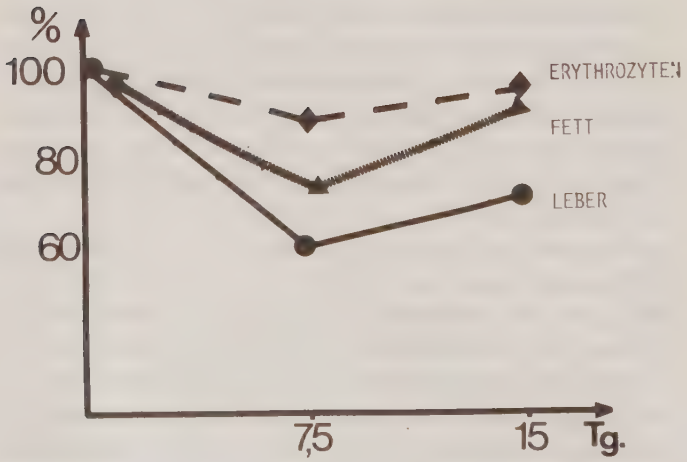

Abb. 1: % Inhibitoreffekt von oral verabreichtem DHEAS auf die G_6PDH verschiedener Rattengewebe.

4. Neben der Aktivitätsminderung der G_6PDH, die nach übereinstimmender Anschauung zahlreicher Autoren durch eine nicht kompetitive Hemmung des Enzyms bedingt ist (Marks und Banks, 1960) zeigt sich unter in vivo Verhältnissen auch bei der im PPS nachgeschalteten 6PGDH ein Aktivitätsverlust bei allen ermittelten Leberwerten und im Blut nach 7 1/2tägiger oraler Steroidapplikation. In vitro Untersuchungen mit DHEA und DHEAS zeigen keinen Inhibitoreffekt auf die 6PGDH und andere Enzyme des energieliefernden Stoffwechsels (Brandau und Luh, 1968; Beitner und Naor, 1972), so daß für diesen Aktivitätsverlust wohl kaum ein direkter Steroideinfluß in Betracht kommt. Im Rahmen des eingeschränkten Glucoseumsatzes über den PPS limitiert durch die G_6PDH tritt wahrscheinlich eine Verarmung an Enzym auf.

   Um einen durch partielle Blockierung des PPS eintretenden veränderten Substratfluß erfassen zu können und einen möglichen systemischen Einfluß größerer Steroidmengen zu erkennen, wurden aus der Embden-Meyerhof-Kette die HK, HIM und GAPDH gemessen. Mit Ausnahme der HK handelt es sich dabei nicht um gesichert adaptive Enzyme. Die HK nun zeigt einen markanten Aktivitätsanstieg in der Leber nach oraler Steroidbelastung von 38 % nach 7,5 Tagen und 65 % nach 15 Tagen und im Fettgewebe von 46 % nach 4tägiger subcutaner Behandlung, was auf den ersten Blick für eine Synthese von neuem Enzym spricht. Die HK-Meßwerte lassen wegen ihrer Uneinheitlichkeit in den verschiedenen Geweben jedoch keine sichere Interpretation zu. Eine erhöhte HK-Aktivität geht mit vermehrter Bereitstellung von G_6P einher, das aber bereits durch den ein-

geschränkten PPS vermehrt anfällt und bekanntermaßen die HK hemmt (Rose und Connell, 1964). Ein gesteigerter glykolytischer Abbauweg ergibt nur dann einen Sinn, wenn dadurch der Ausfall des PPS kompensiert wird und ein anderes H_2 erzeugendes System mit Substrat versorgt werden kann. Ein leichter Aktivitätsanstieg der Leber-HIM, der zeitlich mit der stärksten G_6PDH Hemmung zusammenfällt, läßt sich als Indiz für veränderte Flußraten ansehen. Die Enzymbeträge von GAPDH und HIM reichen jedoch normalerweise aus, um auch größere Substragmengen durch den Embden-Meyerhof-Weg zu schleusen.

In vitro Arbeiten über die HK konnten zeigen, daß nicht nur Substrate, Produkte und Cofaktoren das kinetische Verhalten der HK beeinflussen, sondern auch das Gleichgewicht zwischen gelöster und partikelgebundener HK verändern (Anderson et al., 1971). Durch Zugabe von physiologischen Mengen von G_6P wird mitochondrial gebundene HK in den Oberstand freigesetzt (Rose und Warms, 1967). Da in den hier durchgeführten Tests nur die cytoplasmatisch lokalisierten Enzyme gemessen wurden, läßt sich der HK-Aktivitätsanstieg als eine intrazelluläre Aktivitätsverschiebung erklären, ohne daß sich der Gesamtgehalt der Zelle an HK-Enzym verändern müßte. Ein solcher Effekt tritt übrigens auch immer dann auf, wenn ein Insulinmangel besteht.

EMBDEN-MEYERHOF-KETTE PENTOSE-PHOSHAT-ZYKLUS

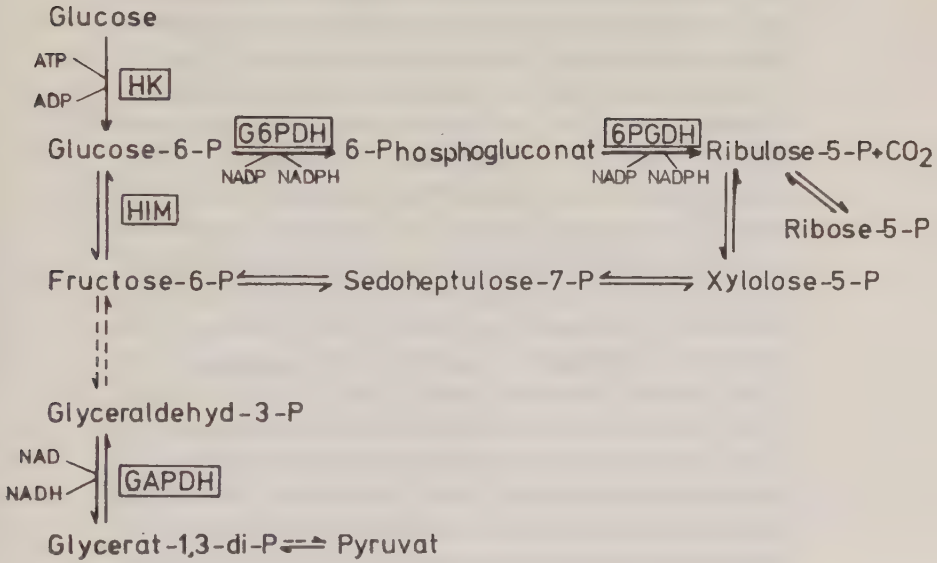

Abb.2 : Schema des Glucosestoffwechsels, an dem die untersuchten Enzyme (umrandet) beteiligt sind [a.n. HORECKER 67]

5. Die vorliegenden Ergebnisse machen es wahrscheinlich, daß DHEA bzw. eines seiner physiologischen Umwandlungsprodukte an der Regulation der G_6PDH-Aktivität teilnimmt und dadurch die Kapazität der NADPH-Produktion des Hydrogenase-Systems in PPS beeinflußt. Das extramitochondrial bereitgestellte NADPH dient als Coenzym bei der Synthese von Fettsäuren, Cholesterin, Cortison, Aldosteron und Phospholipiden und ist unentbehrlich für die Reduktion von Folsäure zu Tetrahydrofolsäure, einem Coenzym der Purinbiosynthese. Außerdem spielt NAPDH eine Rolle bei der Reduktion von Disulfidbindungen, die zu reversibler Inaktivierung vieler Proteine führen. In der roten Blutzelle dienen die über dem PPS bereitgestellten Reduktionspotentiale der Erhaltung der Strukturintegrität. Da der NADPH-pool der Zelle durch eine Reduktion des Pentose-phosphat-Weges vermindert gespeist wird, kann mit einer Beeinflussung dieser Syntheseleistungen gerechnet werden.

   Inwieweit die NADPH-abhängigen Biosynthesen von diesem Defizit betroffen sein könnten, soll am Beispiel der Fettsäuresynthese erläutert werden. In der Rattenleber werden über den PPS wahrscheinlich nur zwei bis fünf Prozent der Glukose verstoffwechselt (Hostetler und Landau, 1967), im Fettgewebe der Ratte soll dieser Anteil 20 bis 34 % betragen (Katz und Rognstad, 1966), jedoch 40 bis 60 % des für die Fettsäuresynthese benötigten NADPH bereitgestellt (Ziboh et al., 1970). Die restlichen benötigten Reduktionsäquivalente stammen von ME. Diese H_2-Bereitstellung soll jedoch für eine übermäßige Fettsynthese nicht

ausreichen (Flat und Ball, 1964), so daß eine H_2-Übertragung von NADH auf NADP angenommen wird, wobei NADP-Malatenzym und lösliche Malatdehydrogenase als eine Art Transhydrogenase-team NADH zur Reduktion von NADP zur Verfügung stellen (Pande, 1964). Es ist hieraus zu folgern, daß ein relatives NADPH-Defizit nicht zwangsläufig eine verminderte Fettsäuresynthese zur Folge haben muß. In vitro Untersuchungen konnten zeigen, daß trotz Hemmung der PPS-Dehydrogenasen durch DHEA eine ausreichende Fettsäuresynthese möglich ist (Teppermann et al., 1968). Andererseits konnte erst kürzlich an bestimmten Mäusen unter dem Einfluß von DHEA die für sie übliche Gewichtszunahme verhindert werden, möglicherweise durch eine Hemmung der Fettsynthese in der Leber (Yen et al., 1977). Bei der Vielschichtigkeit der Untersuchungsergebnisse bleibt die Frage, ob die auch unter in vivo Bedingungen erreichbare Hemmung der G_6PDH durch DHEA einem physiologischen Prinzip entspricht, noch offen.

6. In vivo Untersuchungen über den Inhibitionseffekt von DHEA bzw. DHEAS sind bisher selten. Die Ergebnisse, bei sehr differenter Versuchsanordnung und unterschiedlichen Tierspezies gewonnen, lassen sich nur schwer vergleichen. So konnte eine Untersuchungsgruppe bei Ratten nach einmaliger Gabe von 200 mg/Kg DHEA intrapreitoneal nach 2 Stunden eine Senkung der Leber-G_6PDH um 14 % aber keine solche der Erythrozyten-G_6PDH entdecken. Ein ähnlicher Versuch mit DHEAS führte zu einem nicht signifikanten Verlust der Leber-G_6PDH von 20 % (Hilgertova und Sonka,

1973). Ein anderer Untersucher prüfte die DHEAS-Wirkung nach oraler Applikation von 2 mg/100gKG über 14 Tage in der Leber, Niere, den Testis und Erythrozyten des Meerschweinchens (Bergheim und Oertel, 1975). Wenngleich deutliche Unterschiede im Metabolismus von C_{19}-Steroiden zwischen Ratten und Meerschweinchen oder Mensch andererseits bestehen (Wang und Bulbrook, 1967; Nicol et al., 1972; Feher et al., 1977), zeigen sich bei den vorgelegten Ergebnissen Ähnlichkeiten mit denen bei Meerschweinchen gewonnenen, die bei 8 - 9fach niedriger Steroiddosis vergleichbare Aktivitätseinbußen der Leber- und Erythrozyten-G_6PDH von 30 % bzw. 22 % aufwiesen. Die parenteral schlechte Hemmbarkeit der Leber-G_6PDH durch DHEAS findet in den Experimenten von Hilgertova und Sonka eine gewisse Parallele. Ergebnisse über G_6PDH-Hemmung in Fettgeweben nach oraler DHEAS-Zufuhr liegen in der Literatur noch nicht vor. Die Hypothese, daß Rattenerythrozyten einen grundlegend anderen Besatz an Isoenzymen ihrer Erythrozyten-G_6PDH im Vergleich zum Menschen haben, wird zumindest durch Ergebnisse nach parenteraler DHEAS-Gabe nicht gestützt.

Die eigenen Untersuchungen und die Ergebnisse anderer Autoren zeigen, daß DHEAS im Gegensatz zu in vitro Ergebnissen in vivo zu einem potenten Inhibitor der G_6PDH in vielen Säugetiergeweben wird. Dabei scheint die Darreichungsform, die Konfiguration des Steroids, die Tierspezies und eine gewisse Organsensibilität die Meßergebnisse bzw. die Steroidwirkung zu beeinflussen.

Tabelle 10: Inhibitionswerte von G_6PDH unter in vivo und in vitro Bedingungen zusammengestellt aus der Weltliteratur

Gewebe ( ) Spezies	Inhibitor und Art der Verabreichung tägl. Dosis/Konzentr. Behandlungsdauer	% Hemmung der G_9PDH	Literatur
in vivo:			
Leber (Ratte)	DHEA inj. 2 mg p.d. 5 Tage	31	Hori und Matsui (1967)
Erythrozyten (Mensch)	DHEA oral 100 mg p.d. 3 Tage	13	Lopez-S. und Krehl (1967a)
Erythrozyten (Mensch)	DHEAS oral 30 mg p.d. mehrere Tage	17	Brandau und Luh (1968)
Erythrozyten (Mensch	DHEAS oral 20 mg p.d. 4 Wochen	5	Oertel et al. (1971b)
Leber (Ratte)	DHEA inj. 15 mg/100 gKG 6 Tage	46	Teppermann et al. (1968)
Leber (Meerschwein)	DHEAS oral 2 mg/100 gKG 14 Tage	31	Bergheim und Oertel (1975)
Erythrozyten (Meerschwein)	DHEAS oral 2 mg/100 gKG	23	- " -
Leber (Ratte)	DHEAS intraperitonal 1 x 28.0 mg/100 gKG	20 n.s.	Hilgertova und Sonka (1973)
in vitro:			
Erythrozyten (Mensch)	DHEA 1×10^{-5} M	62	Oertel und Rebelein
	DHEAS 1×10^{-5} M	3	- " -
Leber (Ratte)	DHEA $2{,}5 \times 10^{-6}$ M	42	Hilgertova et al. (1973)
	DHEAS $2{,}5 \times 10^{-4}$ M	42	- " -
Leber (Mensch)	DHEA 5×10^{-6} M	40	Oertel et al. (1970c)
	DHEAS 5×10^{-6} M	4	- " -

E. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der Einfluß vonDehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) auf die G_6PDH in der Leber, dem Fettgewebe und den Erythrozyten der weiblichen Holtzmann-Ratte untersucht. Dabei ergab sich im Gegensatz zu in vitro Untersuchungen nach oraler und s. c. Steroidapplikation eine Hemmung in allen untersuchten Geweben. Oral behandelte Tiere erhielten 7,5 und 15 Tage lang täglich eine Dosis von 15 bzw. 18 mg/100g KG. Parenteral behandelte Tiere erhielten 4 Tage lang 9 mg/100 g KG in zwei täglichen s. c. Injektionen.
Der stärkste Effekt wurde in der Leber nach 7,5 tägiger oraler Versuchsdauer mit einem Aktivitätsverlust von 41 % ermittelt. Die zugehörigen Inhibitionswerte für Fettgewebe und Erythrozyten betrugen 28 % und 13 %. Die oralen Langzeitergebnisse wiesen eine deutliche Abschwächung des Steroideffektes auf. In der parenteralen Versuchsreihe ergaben sich Inhibitionswerte der G_6PDH zwischen 5 % und 22 %. Aus dem Steroideinfluß in vivo resultierte außerdem eine Aktivitätsbeeinflussung von HK und 6PGDH.

Der Wirkungsmechanismus von DHEAS und seine Auswirkung auf den Stoffwechsel wurden diskutiert. Danach dürfte die exogene Steroidzufuhr durch entsprechende Metabolisierung des DHEAS zu einer nicht kompetetiven Hemmung der G6PDH führen. Aus einer dadurch verminderten Kapazität der NADPH-Produktion des Hydrogenase-Systems im PPS kann mit einer Beeinflussung der wasserstoffabhängigen

Biosynthesen gerechnet werden. Auswirkungen auf andere Enzyme des energieliefernden Stoffwechsels werden ursächlich der "hormonellen" Aktivität des Steroids und den Versuchsbedingungen zugeschrieben. Neben der unbestrittenen Funktion als Vorstufe von Androgenen und Östrogenen zu dienen, sollte dem DHEAS durch seine Eigenschaft, die G6PDH selektiv und nicht organspezifisch zu hemmen, eine weitere physiologische Bedeutung möglicherweise die eines direkten Stoffwechselregulators zukommen.

F. ANHANG

1. Liste der verwendeten Abkürzungen:

Enzyme:

F1,6diPase	Fruktose-1,6-diphosphatase
F6PK	Fruktose-6-phosphat-kinase
GAPDH	Glyceraldehyd-3phosphat-dehydrogenase
G6Pase	Glucose-6phosphatase
G6PDH	Glucose-6phosphat-dehydrogenase
HIM	Glucosephosphat-isomerase
HK	Hexokinase
PGK	3Phosphoglycerat-kinase
6PGDH	6Phosphogluconat-dehydrogenase

Coenzyme:

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
NAD^+/NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, oxidiert/red.
$NADP^+$/NAPDH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, ox./red.

Substrate:

F6P	Fruktose-6phosphat
G6P	Glucose-6phosphat
D-Gluc	D-Glucose
3PGS	3-Phosphoglycerat-D-Glyceraldehyd-3phosphat
6PGS	6-Phosphogluconat

Puffer:

EDTA	Äthylendiamin-tetraacetat-Puffer
TRAP	Triäthanolamin-Puffer

Hormone:

DHEA	Dehydroepiandrosteron(3-ß-hydroxy-androst-5-en-17-on)
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-sulfat(17-oxoandrost-5-en-3-ß-yl-sulfat)
DHEASD	Dehydroepiandrosteron-sulfatid (Diglyceridschwefelsäureester des DHEA)

2. Meßreaktion und Testzusammensetzung der verwendeten Enzyme:

Glucose-6phosphat-dehydrogenase /G6PDH)

Glucose-6-phosphat + $NADP^+$ ⟶ 6-Phosphogluconat + NADPH + H^+
TRAP 50 Millimol (mM), EDTA 5 mM, G6P 2 mM (Start), $NADP^+$ 0.4 mM, Extrakt.

Die Wasserstoffionenkonzentration beträgt (pH) 7,6, die Meßtemperatur (t) 25°C, die Wellenlänge (λ) 366 nm.

6Phosphogluconat-dehydrogenase (6PGDH)

6-Phosphogluconat $\xrightarrow[Mg^{++}]{}$ Ribulose-5-phosphat + CO_2 + NADPH + H^+

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, $MgSO_4$ 8 mM, 6PGS 1 mM (Start), $NADP^+$ 0.4 mM, Extrakt.

Hexokinase (HK)

Hexose + ATP $\xrightarrow[Mg^{++}]{}$ Hexose-6-phosphat + ADP

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, $MgSO_4$ 8 mM, D-Gluc 1 mM, ATP 1.5 mM, $NADP^+$ 0.4 mM, G6PDH 40 Internationale Einheiten (IE)/ml Testvolumen (TV), Extrakt (Start).

Glucosephosphatisomerase (HIM)

Glucose-6-phosphat $\longrightarrow$ Fruktose-6-phosphat

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, F6P 1.6 mM, $NADP^+$ 0.4 mM, G6PDH 40 IE/ml TV, Extrakt (Start).

Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)

D-Glyceraldehyd-3-phosphat + NAD^+ + HPO_4^{--} $\longrightarrow$ D-1,3-diphosphoglycerat + NADH + H^+

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, $MgSO_4$ 3.3 mM, Glutathion 2.4 mM, 3-PGS 7 mM, ATP 1.5 mM, NADH 0.15 mM, PGK 200 IE/ml TV, Extrakt (Start).

3. Literaturverzeichnis:

ADLERCREUTZ, H., KERSTELL, J., SVABORG, A. und VIHKO, R.:
Studies in plasma neutral steroidsulphates, urinary 11-deoxy-17-ketosteroids and estrogens, and plasma lipids in patients with hypercholesterolemia or hyperlipemia.
Ann.Med.exp.Fenn. 46, 165-167 (1968).

ANDERSON, J. W., HERMAN, R. H., TYRRELL, J. B. und COHN, R. M.:
Hexokinase: A compartmented enzyme.
Am.J.Clin.Nutr. 24, 642-650 (1971)

BAULIEU, E. E. und DRAY, F.:
Conversion of ^{3}H-dehydroepiandrosterone (3β-hydroxy- Δ^{5}-androsten-17-one) sulphate to ^{3}H-estrogens in normal pregnant woman.
J.clin.Endocrinol.Metab. 23, 1298-1301 (1963)

BAULIEU, E. E.:
Studies on conjugated 17-ketosteroids in a case of adrenal tumor.
J.Crin.Endocrinol.Metab. 22, 501-510 (1962)

BEITNER, R. und NAOR, Z.:
The effect of adenine nucleotides and dehydroepiandrosterone on the isoenzymes of $NADP^{+}$ - and NAD^{+} -glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from rat adipose tissue.
Biochim.Biophys. Acta 286, 437-440 (1972)

BERGHEIM, E. und OERTEL, G. W.:
Effects of exogenous dehydroepiandosteron sulphate on various enzymes and on steroid metabolism in the guinea pig.
J.Endocr. 70, 11-17 (1975)

BRANDAU, H. und LUH, W.:
Der Einfluß von Steroidhormonen auf die Glucose-oxydation.
Geburtsh. Frauenheilk., 28, 1074-1075 (1968)

BOCHER, Th., LUH, W. und PETTE, D.:
"Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden." In HOPPE-SEYLER/THIERFELDER: "Handbuch der physiologisch- undpathologisch-chemischen Analyse," Bd. VI A, S. 292-339, Berlin, Springer, 1964, 10. Aufl.

COHN, G. L., MULROW, P. J. und DUNNE, V. C.:
In vitro synthesis of dehydroepiandrosterone sulfate by an adrenal adenoma.
J.Clin.Endocrinol.Metab., 23, 671-676 (1963)

FEHER, T., BODROG, L., FEHER, K. G., POTECZIN, E. und KULESEY, I. S.:
Free and Solvolysable dehydroepiandrosterone and androsterone in blood of mammals under physiological conditions and following administration of dehydroepiandrosterone.
Acta Endocrin., 85, 126-133 (1977)

FLATT, J. P. und BALL, E. G.:
Studies on the metabolism of adipose tissue.
J.Biol.Chem., 239, 675-685 (1964)

FRIES, N., KNAPSTEIN, P., WENDLBERGER, F. und OERTEL, G. W.:
Entero-hepatischer Kreislauf von C_{19}-Steroiden V: Resorption und Rekonjugation von 7α-^{3}H-DHEA-^{35}S-Sulfat im Dünndarm des Menschen in vivo.
Acta Endocrin., 56, 705-712 (1967)

GIANELLY, A. A.:
inhibition of cholesterol biosynthesis by dehydroepiandrosterone in lactating mammary gland.
Endrocrinology, 83, 1311-1315 (1968)

HARPER, M. J. K.:
Estrogenic effects of dehydroepiandrosterone and its sulfate in rats.
Endocrinology, 84, 229-235 (1969)

HILGERTOVA, J. und SONKA, J.:
Effects of cold exposure, thyroidextract, methyl thiouracil and dehydroepiandrosterone on glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase in rat liver and erythrocytes.
Horm.Metab.Res., 5, 286-289 (1973)

HOFFMANN, G., WENDLBERGER, F., ZIMMERMANN, H.-J. und OERTEL, G. W.:
Metabolism of steroid conjugates XIV. In vivo perfusion of human muscle tissue with 7a-^{3}H-dehydroepiandrosterone sulfatide.
Endocrinologie, 63, 353-357 (1974)

HOLZMANN, H., MORSCHES, B., GEBHARDT, R., HOFFMANN, G. und OERTEL, G. W.:
Untersuchungen zum DHEA-Gehalt im Plasma von Psoriatikern.
Z.Haut-u.Geschl.-Kr., 45, 579-590 (1970)

HORECKER, B. L.:
Glucose-6-phosphate dehydrogenase, the pentose phosphate cycle, and its place in carbohydrate metabolism.
Am.J.Clin.Pathol., 47, 271-281 (1967)

HORI, S. H. und MATSUI, S. I.:
Effects of hormons on hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase of rat.
J.Histochem.Cytochem., 15, 530-534 (1967)

HOSTETLER, K. Y. und LANDAU, B. R.:
Estimation of pentose cycle contribution to glucose metabolism in tissue in vivo.
Biochemistry, 6, 2961-2964 (1967)

KATZ, J. und ROGNSTAD, R.:
The metabolism of tritiated glucose by rat adipose tissue.
J.Biol.Chem., 241, 3600-3610 (1966)

KNAPSTEIN, P., RINDT, W., TREIBER, L. und OERTEL, G. W.:
Enterohepatischer Kreislauf von C_{19}-Steroiden, II. Rekonjugation von 7α -^{3}H-DHEA^{35}S-Sulfat und 7α-^{3}H-DHEA-^{14}C-Glucoronosid in Dünndarm und Leber des Meerschweinchens.
Z. physiol. Chem., 346, 192-197 (1966)

KNAPSTEIN, P., WENDLBERGER, F. und OERTEL, G. W.:
Entero-hepatic circulation of 7α -^{3}H-DHEA-^{35}S-sulfate, 7α -^{3}H-DHEA-^{14}C-glucoronoside and free 7α -^{3}H-DHEA in the human.
Experientia (Basel), 23, 480-484 (1967)

LOPEZ-S., A. und KREHL, W. A.:
In vivo effect of dehydroepiandrosterone on red blood cells glucose-6-phosphate dehydrogenase.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 126, 776-778 (1967a)

LOPEZ-S., A. und KREHL, W. A.:
A possible interrelation between glucose-6-phosphate dehydrogenase and dehydroepiandrosterone in obesity.
Lancet, 2, 485-487 (1967b)

LOPEZ-S., A. und RENE, A.:
Effect of 17-ketosteroids on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity (G_6PD) and on G_6PD isoenzymes.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 142, 258-261 (1973)

MARKS, P. A. und BANKS, J.:
Inhibition of mammalian glucose-6-phosphate dehydrogenase by steroids.
Proc.Natl.Acad.Sci., US 46, 447-452 (1960)

McKERNS, K. W. und KALEITA, E.:
Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by hormones.
Biochem.Biophys.Res.Commun., 2, 344-348 (1960)

MULDER, E., LAMERS-STAHLHOFEN, G. J. M. und VAN DER MOLEN, H. J.:
Metabolism of free and conjugated steroids by intact and haemolysed mammalian erythrocytes.
Biochim.Biophys.Acta 260, 290-297 (1972)

NICOL, M., SAVOURE, N. und LERAY, G.:
Sur le metabolisme experimental de la dehydroepiandrosterone chêz le rat, in vivo.
Comptes Rendus des Seances de la Societē de Biologie et de ses Filiales, 166, 1356-1360 (1972).

OERTEL, G. W. und GROOT, K.:
Ober Steroidkonjugate im Plasma, XIII. Isolierung, Eigenschaften und Zusammensetzung eines biosynthetischen, lipophilen Dehydroepiandrosteron-Konjugats.
Z.physiol.Chem., 341, 1-9 (1965)

OERTEL, G. W. und KANPSTEIN, P.:
Hydrolysis of DHEA sulphate after oral application.
Experientia, 24, 73-74 (1967)

OERTEL, G. W. und REBELEIN, I.:
Effects of dehydroepiandrosterone and its conjugates upon the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes.
Biochim.Biophys.Acta, 184, 459-460 (1969)

OERTEL, G. W., MENZEL, P. und BAUKE, D.:
Effects of dehydroepiandrosterone and its conjugates upon the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase. III. Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human ovarian tissue.
Steroidologia, 1, 2-7 (1970a)

OERTEL, G. W. und MENZEL, P.:
Inhibition of human glucose-6-phosphate dehydrogenase activity by dehydroepiandrosterone sulfatide.
Medica Int.Congr.Series, 210, 163 (1970b)

OERTEL, G. W., MENZEL, P. und BAUKE, D.:
Effects of dehydroepiandrosterone and its conjugates upon the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase.
Clin.Chim.Acta, 27, 197-201 (1970c)

OERTEL, G. W.:
Dehydroepiandrosterone in biochemischer und klinischer Sicht.
Arzneimittel-Forsch., 21, 543-545 (1971a)

OERTEL, G. W., MENZEL, P., HOFFMANN, G., HOLZMANN, H., MORSCHES, B. und GEBHARDT, R.:
Steroide und Haut. V. Dehydroepiandrosteron in Plasma und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Aktivität in Erythrozyten von Psoriatikern vor und nach Gabe von Dehydroepiandrosteronsulfat.
Z.klin.Chem. und klin.Biochem., 9, 28-30 (1971b)

OERTEL, G. W. und BENES, P.:
The effects of steriods on glucose-6-phosphate dehydrogenase.
J.Steroid Biochem., 3, 493-496 (1972)

PANDE, S. V., PARVIN KHAN, R. und VENKITASU BRAMANIAN, T. A.:
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific dehydrogenase in relation to lipogenesis.
Biochim.Biophys.Acta, 84, 239-250 (1964)

PUCHE, R. C.:
Metabolism of dehydroepiandrosterone-sulfate in the rat.
Eur.J.Steroids, 2, 171-191 (1967)

ROBERTS, K. D., VANDE WIELE, R. L. und LIEBERMANN, S.:
The conversion in vivo of dehydroisoandrosterone sulfate to androsterone and etiocholanolone glucuronidates.
J.Biol.Chem., 236, 2213-2215 (1961)

ROSE, I. A. und O'CONNEL, E. L.:
The role of glucose-6-phosphate in the regulation of glucose metabolism in human erythrocytes.
J.Biol.Chem., 239, 12-17 (1964)

ROSE, I. A. und WARMS, J. V. B.:
Mitochondrial hexokinase; release, rebinding and location.
J.Biol.Chem., 242, 1635-1641 (1967)

ROY, A. B.:
The sulphatase of ox liver 6. steroid sulphatase.
Biochem.J., 66, 700-703 (1957)

SIITERI, P. K. und MacDONALD, P. C.:
Estrogen formation in human pregnancy.
J.Clin.Endocr., 26, 751-761 (1966)

SLAUNWHITE, W. R. Jr., BURGETT, M. J. und SANDBURG, A. A.:
Disposition of dehydroepiandrosterone and its sulphate in human subjects.
J.Clin.Endocr., 27, 663-670 (1967)

SONKA, J., GREGOROVA, I., PAV, J. und SKRHA, F.:
Dehydroepiandrosterone in obese diabetics.
Lancet, 2, 44-45 (1964)

SONKA, J., GREGOROVA, I., JIRANEK, M., KÜLBEL, F. und MATYS, Z.:
Defekt des Dehydroepiandrosterons - Ein neues Syndrom?
Endokrinologie, 47, 152-161 (1965)

TEPPERMANN, H. M., DE LA GARZA, S. A. und TEPPERMANN, Y.:
Effects of dehydroepiandrosterone and diet protein on liver enzymes and lipogenesis.
Am.J.Physiol., 214, 1126-1132 (1968)

TOMKINS, G. M., YIELDING, K. L. und CURRAN, J.:
Steroid hormone activation of l-alanine oxidation catalysed by a subunit crystalline glutamic dehydrogenase.
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S., 47, 270-278 (1961)

TSUTSUI, E. A., MARKS, P. A. und REICH, P.:
Effect of dehydroepiandrosterone on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and reduced triphosphohydrine nucleotide formation in adrenal tissue.
J.Biol.Chem., 237, 3009-3013 (1962)

WANG, D. Y., BULBROOK, R. D., SNEDDON, A. und HAMILTON, T.:
The metabolic clearance of dehydroepiandrosterone, testosterone and their sulphate esters in man, rat and rabbit.
J.Endocr., 38, 307-318 (1967)

WARBURG, O. und CHRISTIAN, W.:
Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten (Pyridin-Nucleotide).
Bioch. Zeitschr. 287, 291-328 (1936)

Verbrennung von Robinson-Ester durch Triphospho-Pyridin-Nucleotid.
Bioch. Zeitschr. 287, 440-441 (1936)

WEINAND, H., RINDT, W. und OERTEL, G. W.:
In-vivo-Perfusion der Meerschweinchenleber mit Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteron-"Sulfatid" und -sulfat.
Endokrinologie, 50, 145-162 (1966)

WILLMER, J. S. und FOSTER, T. S.:
The influence of dehydroepiandrosterone and pregnenolone upon adaption of hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase to refeeding a high-glucose diet after fasting.
Canad.J.Biochem., 43, 1375-1377 (1965)

YEN, T. T., ALLAN, J. A., PEARSON, D. V., ACTON, J. M. und GREENBERG, M. M.:
Prevention of obesity in A^{vy}/a mice by dehydroepiandrosterone.
Lipids, 12, 409-413 (1977)

ZIBOH, V. A., DREZE, M. A. und HSIA, S. L.:
Inhibition of lipid synthesis and glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat skin by dehydroepiandrosterone.
J.Lipid.Res., 11, 346-354 (1970)

Mein ausdrücklicher Dank an dieser Stelle gilt

Herrn Professor Dr. med. H. Brandau,

der mir freundlicherweise die Bearbeitung des vorliegenden Themas zur Dissertation überließ und mich bei der Durchführung der Arbeit in besonderem Maße unterstützt hat.

Lebenslauf

Am 25. 5. 1942 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Walter Schaefer und seiner Ehefrau Edith, geb. Iwan, in Holzminden/Weser geboren.

Nach der Volksschule besuchte ich ab 1953 die mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasien in Holzminden und Herzberg, wo ich im Februar 1962 das Abitur ablegte.

Nach zweijähriger Bundeswehrzeit begann ich das Studium der Humanmedizin im SS 1964 in Marburg/Lahn und setzte es bis zum Physikum in Köln fort. Das Studium der klinischen Fächer absolvierte ich in Innsbruck und Kiel.

Nach dem Staatsexamen im August 1970 in Kiel kam ich als Medizinalassistent an die Medizinische Hochschule in Hannover zu Herrn Prof. Dr. H. Brandau, bei dem ich die experimentellen Arbeiten für die vorgelegte Dissertation ausführte.

Nach der Approbation im Oktober 1971 und längerer nichtärztlicher Tätigkeit begann ich im August 1973 in München die ärztliche Ausbildung im Fachgebiet Radiologie, die ich zum Jahresende 1979 abschließen werde.

München, November 1979

Hartwig Schaefer

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80